热激条件下家蚕血液 30K 蛋白磷酸化研究

李　娜[1]　贾漫丽[1]　杨贵明[1]　李季生[1,2*]

（1.承德医学院蚕业研究所，河北省高校特产蚕桑应用技术研发中心，承德　067000；

2.浙江大学动物科学学院，杭州　310029）

摘　要：本试验旨在研究热激条件下家蚕血液磷酸化蛋白的表达变化，为深入研究其功能提供参考。试验设对照组和热激组，每组选取五龄第 3 天家蚕幼虫各 30 头（雌雄各占 1/2），在 40 ℃条件下分别热激处理 0、10 min，然后利用双向电泳、Pro-Q Diamond 染色、质谱技术对表达差异的磷酸化蛋白进行研究。结果表明：1）银染图谱 30 ku 区积累了大量蛋白，经 Pro-Q Diamond 染色后发现它们属于磷酸化蛋白。2）经过多次取样和质谱鉴定，最终获得了 3 个 30K 蛋白，分别是 PBMHPC-6、PBMHPC-19 和 PBMHPC-12。3）热激处理 10 min 后，3 个 30K 蛋白的表达量与热激处理 0 min 相比显著上调($P<0.05$)。由此得出，五龄家蚕血液富含 30K 蛋白，它们不仅在脂质运输方面承担着重要的角色，而且很可能参与热激应答。

关键词：热激；家蚕；血液；30K 蛋白；磷酸化；双向电泳

中图分类号：S881.24　　　　文献标识码：A　　　　文章编号：

蛋白质的磷酸化修饰是广泛存在于生物体内各种组织细胞中的一种蛋白质翻译后修饰方式，机体大约 30%的蛋白质可发生不同形式的磷酸化[1]，它参与和调控生物体内的许多生命活动。生物体通过蛋白质的磷酸化与去磷酸化，调控信号转导、基因表达、细胞周期等诸多细胞过程。研究表明，植物体内某些蛋白质的磷酸化与温度胁迫存在一定的关系，比如叶绿体 D1 蛋白和光系统 II 蛋白等。因此，研究蛋白质的磷酸化不仅可以了解其对蛋白质功能的影响，而且还可以帮助我们更加深入地理解生命系统在分子水平的调控状况[2]。

收稿日期：2015-12-18

基金项目：河北省教育厅资助项目（No.Q2012026）

作者简介：李　娜（1981-），女，河北邢台人，助理研究员，硕士，主要研究方向动物遗传学。E-mail: liyunxiao2008@163.com

*通信作者：李季生，副研究员，E-mail: jshlee@163.com

30K 蛋白是一类在氨基酸组成及免疫学活性上相似的蛋白质，理论等电点在 6.1～8.4 之间，分子质量约为 30 ku[3]。在家蚕（*Bombyx mori*）体中目前至少有 35 种分子质量约为 30 ku 的脂蛋白登录在美国国立生物技术信息中心（NCBI）上，有人推测其多样化可能与蛋白质的磷酸化有关。30K 蛋白在五龄蚕幼虫和蚕蛹的血液中大量积累，由脂肪体合成分泌，表达量受保幼激素的调节[4]。30K 蛋白是家蚕生长发育过程中极其重要的储藏蛋白，也有研究指出 30K 蛋白中的 6G1 和 19G1 可以特异性的与葡萄糖及葡聚糖结合，参与昆虫的免疫反应[5]；而且，19G1 还可能是家蚕血液中抗细胞凋亡最强的成分[6]。尽管人们通过试验的手段掌握了一些 30K 蛋白的功能，但是还有大量 30K 蛋白的功能处于未知状态[7]。比如，30K 蛋白是否参与热激应答，其磷酸化是否与热激有关等，还需要进一步研究。

家蚕是重要的经济昆虫，同时也是鳞翅目昆虫的代表和模式种[8]。温度对家蚕尤其是壮蚕期的生长发育至关重要，高温往往是造成夏秋季蚕茧减产和茧质下降的主要原因。鉴于 30K 蛋白在五龄家蚕血液中的地位和角色以及蛋白质磷酸化在生物活动中发挥的重要作用，本试验利用高温刺激家蚕，借助双向电泳、Pro-Q Diamond 荧光染色以及质谱技术探讨家蚕血液中 30K 蛋白的功能，分析其表达变化和磷酸化现象，进一步研究它们在环境胁迫中发挥的作用。

1　材料与方法

1.1　试验材料

供试家蚕品种为秋丰（Q），由浙江大学动物科学学院蚕桑遗传育种实验室提供。家蚕幼虫均用新鲜桑叶按照常规条件饲育至五龄第 3 天。试验设对照组和热激组，每组随机选取 30 头五龄第 3 天家蚕幼虫（雌雄各占 1/2），放在 40 ℃的培养箱中分别热激 0、10 min 后，剪尾角取血，血液样品经液氮冷冻后于-80 ℃保存备用。

1.2 血液蛋白制备

取出血液样品，放在冰上低温缓慢解冻，然后按 1 μL 血液加 10 μL 裂解缓冲液[8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4%(*v*/*v*)3-环乙胺-1-丙磺酸、2%(*v*/*v*)载体两性电解质(pH 3～10)和 30 mmol/L 二硫苏糖醇]的比例加入裂解缓冲液，25 ℃振荡混匀，并在 30 ℃摇床上摇动，每隔 10 min 振荡混匀 1 次。室温下放置 10 min，超声波处理 30 s，冰浴 30 s，重复 4 次，以使样品充分裂解。于 4 ℃下 15 000 r/min 离心 2 次，每次 15 min，吸取上清液。血液蛋白定

量方法采用 Bradford[9]的方法，在 595 nm 处测定标准蛋白和样品的吸光度，采用标准曲线法测定计算样品蛋白浓度。最后，根据所需蛋白量分装至离心管中，-20 ℃下保存备用。

1.3 双向电泳及染色

双向电泳参考 Zhou 等[10]的报道，采用 Ettan IPGphor3 等电聚焦和聚丙烯酰胺凝胶电泳垂直电泳系统 Ettan Daltsix (Amersham Biosciences)，胶条采用 pH 为 3～10 的 24 cm 线性干胶条。双向电泳完成后，小心取出凝胶，清洗后进行硝酸银和 Pro-Q Diamond 荧光染色。

1.4 图谱扫描和分析

银染胶采用 Image Scanner 2D 扫描仪(Amersham Bioscience)进行扫描。通过 Image Master 2D platinum 分析软件进行图像分析，检测蛋白斑点，计算蛋白点百分体积，并预测其分子质量和等电点。

1.5 30K 蛋白质谱鉴定和表达分析

挖取 Pro-Q Diamond 荧光染色胶中对应的 30K 蛋白点，送交浙江理工大学进行质谱鉴定。胶内酶解方法参照 Gharahdaghi 等[11]的报道。质谱鉴定采用文献[12]中的方法和参数，质谱仪为 ABI 公司生产的 4700 Proteomics Analyzer。数据库选用 NCBInr，搜库软件为 GPS Explore^{TM} software。

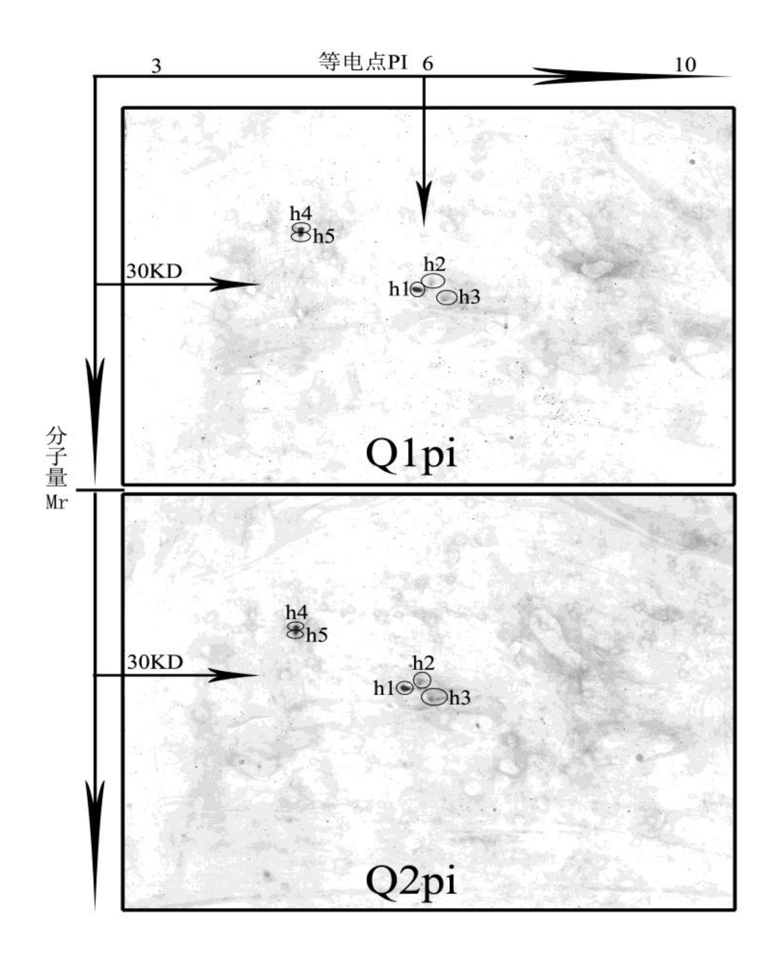
1.6 鉴定蛋白磷酸化位点预测

首先登录 NCBI 数据库进行比对，得到鉴定蛋白的 Fasta 序列。下载保存后，利用 KinasePhos（http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/）在线提交。预测参数的设定如下：预测位点选择酪氨酸(Y)、丝氨酸(S)与苏氨酸（T）3 种氨基酸，激酶选择非特定，特异性为 100%，进行磷酸化位点的预测[13]。

2 结果与分析

2.1 血液磷酸化蛋白图谱分析

图 1 为 Pro-Q Diamond 染色后不同热激时间五龄第 3 天家蚕血液磷酸化蛋白双向电泳图谱。从图中可以看出，对照组（Q1pi）和热激组（Q2pi）中各发现磷酸化蛋白点 5 个（h1、h2、h3、h4 和 h5）。通过分析分子质量和等电点，结果发现，h4 和 h5 的分子质量在 45 ku 左右，等电点在 4.6 左右，因此可以推测它们是 30K 蛋白的可能性极小。另外，从着色深浅判断，h1、h4 和 h5 的颜色明显比 h2 和 h3 重，说明这 3 个蛋白的表达量较高，而且 h1 在性质上可能与 h2 和 h3 有一定的差异。图 2 为 30K 蛋白银染图和 Pro-Q Diamond 染色图。从银染图中可以看出，h1、h2 和 h3 这 3 个蛋白与其他蛋白处于胶着状态，表明五龄家蚕血液中累积了大量的 30K 蛋白，可能在蚕体脂质运输方面承担着重要的角色。



Q1pi、Q2pi 中，Q 表示品种秋丰，阿拉伯数字 1、2 分别代表对照组和热激组，pi 表示磷酸化。下图同。

In Q1pi、Q2pi, Q standed for Qiufeng, while the Arabic numerals 1 and 2 represented control group and heat shock group, respectively, and pi standed for phosphorylation. The same as below.

图 1　家蚕血液磷酸化蛋白双向电泳图谱

Fig.1　Two-dimensional electrophoresis map of phosphorylation proteins from silkworm haemolymph

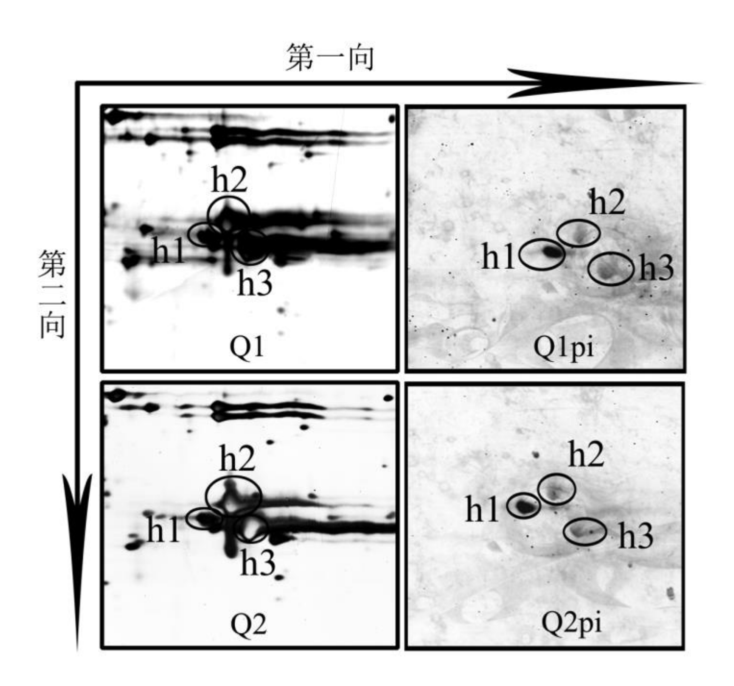


图 2　30K 蛋白银染图（左）和 Pro-Q Diamond 染色图（右）

Fig.2　Silver stain map (L) and Pro-Q Diamond dye map (R) for 30K proteins

2.2　30K 蛋白的质谱鉴定

通过多次取样和重复测定，成功鉴定了 h1、h2 和 h3 这 3 个蛋白（表 1），它们分别是 30K 蛋白中的 PBMHPC-6（h1）、PBMHPC-19（h2）和 PBMHPC-12（h3）。

表 1　家蚕血液中 30K 蛋白的质谱鉴定

Table 1　MS identification of 30K proteins in silkworm haemolymph

序号 No.	蛋白名称 Protein identity	登录号 Accession No.	肽段匹配数 Number of matched peptides	蛋白得分 Protein score	序列覆盖度 Sequence covered/%	计算等电点 Calculated pI	计算分子质量 Calculated Mr/ku
h1	PBMHPC-6	gi|112984502	11	80	65.2	5.90	28
h2	PBMHPC-19	gi|156119322	13	108	51.7	6.01	31
h3	PBMHPC-12	gi|156119320	11	111	42.5	5.80	29

表 2　3 个 30K 蛋白磷酸化预测位点

Table 2　Predicted phosphorylated sites of three 30K proteins

蛋白名称	预测磷酸化位点 Predicted phosphorylated sites

Protein identity	丝氨酸 Serine (S)	苏氨酸 Threonine (T)	酪氨酸 Tyrosine (Y)
PBMHPC-6	1	2	3
PBMHPC-19	0	1	3
PBMHPC-12	3	1	2

质谱鉴定结果表明（表 1），3 个蛋白的序列覆盖度都在 42.5%以上，蛋白得分最低为 80 分，匹配肽段数都在 11 个之上，等电点、分子质量和理论值相差不大，说明了鉴定结果的可靠性。

2.3　30K 蛋白差异分析及磷酸化位点预测

从图 2 左侧的银染图可以看出，3 个蛋白点几乎聚集在一起，和周围蛋白呈现胶着状态，所以无法进行表达差异分析。Pro-Q Diamond 荧光染色解决了这个问题，从图 2 右侧的 Pro-Q Diamond 染色图上看，3 个蛋白得到了很好的分离，尤其是 h1 着色明显，表达量大。通过 Image Master 2D platinum 分析软件计算蛋白点百分体积，结果发现，热激处理 10 min 后 3 个蛋白（PBMHPC-6、PBMHPC-19 和 PBMHPC-12）的百分体积分别是对照组的 2.15、1.86 和 1.81 倍。根据惯例，把蛋白百分体积比值大于 1.8 或小于 0.55 作为差异显著的判定标准，这说明 3 个 30K 蛋白的表达量在热激处理后显著上调，意味着它们很可能参与热激应答。

采用 KinasePhos 软件预测 3 个蛋白的磷酸化位点，发现 PBMHPC-6 和 PBMHPC-12 各有 6 个位点可能会发生磷酸化，PBMHPC-19 有 4 个位点（表 2）。以 PBMHPC-6 为例，6 个位点共预测出 10 个可选修饰。根据 E 值和隐马尔科夫得分剔除假阳性率高的修饰，得到了第 34、76、140、169、217 和 239 位氨基酸上的可能修饰，以及 5 种磷酸化蛋白激酶（表 3）。

表 3　PBMHPC-6 磷酸化预测位点

Table 3　Predicted phosphorylated sites of PBMHP-6

位置(氨基酸) Locations (AA)	磷酸化位点 Phosphorylated sites	隐马尔科夫分值 HMM Bit score	E 值 *E*-value	激酶 Kinases	标志
34	AEQLYMSVV	0.1	4.4	Abelson murine leukemia virus oncoprotein (Abl)	
76	GKRNTMDFA	-0.1	2.7	cAMP 依赖性蛋白激酶(PKA)	
140	SKDKTSKKV	-2.4	14	蛋白激酶 C(PKC)	
169	EDKQYLKLD	-0.3	4.5	脾酪氨酸激酶(Syk)	
217	YNREYNSVM	-2.5	12	Syk	
239	ALGHSGEVS	-3.6	18	共济失调毛细血管扩张突变激酶(ATM)	

3 讨 论

30K 蛋白是家蚕血液中丰度比较高的一类蛋白质，其表达具有时空特异性[14]。半定量PCR 结果显示，家蚕大部分的 30K 蛋白基因活性在五龄第 3 天起上升，五龄第 4 天开始到吐丝期活性最高[15]。Sun 等[14]对家蚕血液进行了双向电泳和质谱分析，结果发现 5 个不同的30K 蛋白被多次检测到，推测其多样化可能与蛋白质的磷酸化有关。随后，他们用 SignalP程序对 30K 蛋白的氨基酸序列信号肽进行了预测，结果发现它们的基因都含有信号肽，说明它们具有分泌性蛋白的属性。因为 30K 蛋白序列同源性较高，加之分子质量大小相似，所以其分离纯化是一个复杂的过程。从本试验的结果来看，30K 蛋白聚集在一起呈现胶着状态（图 2），很难通过 Imagemaster 软件对银染图进行定量分析。而本试验借鉴前人的研究，采用 Pro-Q Diamond 染料对这些蛋白进行特异性染色，既保证了试验较高的灵敏性，还可以与质谱鉴定兼容[15]。本试验正是借助了 Pro-Q Diamond 荧光染色法的优点使得 30K 蛋白得以分开。

Sun 等[14]基于家蚕基因组图谱和 30K 蛋白基因序列整合了 10 个 30K 蛋白的基因，发现5 个基因 *Bmlp*1、*Bmlp*4、*Bmlp*7、*Bmlp*8 和 *Bmlp*10 都有 1 个核转录因子 κB（NF-κB）结合位点，该因子的主要功能是调节与免疫应答相关基因的表达。Yang 等[15]对家蚕血浆 30K 蛋白进行了天然分离、重组表达和结构解析，认为 *Bmlp*7 的 N 段区域（NTD）可能具有结合脂的能力，而 C 段区域（CTD）存在结合糖的潜在位点，因而可能间接的参与昆虫的天然免疫反应。通过本试验对荧光图谱的分析，发现 30K 蛋白在短时间的热激之后都呈现表达显著上调的趋势。这是否暗示着 30K 蛋白的功能可能与胁迫应答有关？有研究发现温度胁迫可以引起甘蓝 22.9K 蛋白的磷酸化现象，而且在逆境温度处理 10 min 内，磷酸化蛋白含量升高[16]。这个结果在本试验中得到了进一步的验证，暗示了蛋白质磷酸化在逆境胁迫中的作用。另外，由于蛋白质的磷酸化和激酶有关，而且磷酸化位点主要发生于酪氨酸、丝氨酸与苏氨酸残基上[17]，因此大量的预测磷酸化位点的工具得到了开发。本实验借助KinasePhos 软件对 3 个 30K 蛋白(PBMHPC-6、PBMHPC-19 和 PBMHPC-12)的磷酸化位点进行了预测，为进一步研究它们的磷酸化提供了参考，但是具体位点和作用激酶仍需要经过试验的验证。

4 结 论

① 40 ℃热激家蚕 10 min 后有 3 个 30K 蛋白(PBMHPC-6、PBMHPC-19 和 PBMHPC-12)发生了磷酸化。这 3 个 30K 蛋白热激后表达量显著上调，说明 30K 蛋白很可能参与热激应答。

② KinasePhos 软件预测发现 30K 蛋白 PBMHPC-6 和 PBMHPC-12 各有 6 个位点可能会发生磷酸化，而 PBMHPC-19 仅有 4 个位点可能会发生磷酸化。

参考文献:

[1] RAGGIASCHI R,GOTTA S,TERSTAPPEN G C.Phosphoproteome analysis[J].Bioscience Reports,2005,25(1/2):33–44.

[2] 杨策,王正国,朱佩芳.蛋白质组中蛋白质磷酸化研究进展[J].生理科学进展,2004,35(2):119–124.

[3] KIM E J,PARK H J,PARK T H.Inhibition of apoptosis by recombinant 30K protein originating from silkworm hemolymph[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2003,308(3):523–528.

[4] SAKAI N,MORI S,IZUMI S,et al.Structures and expression of mRNAs coding for major plasma proteins of *Bombyx mori*[J].Biochimica et Biophysica Acta：Gene Structure and Expression,1988,949(2):224–232.

[5] UJITA M,KIMURA A,NISHINO D,et al.Specific binding of silkworm *Bombyx mori* 30-kDa lipoproteins to carbohydrates containing glucose[J].Bioscience,Biochnology,and Biochemistry,2002,66(10):2264–2266.

[6] KIM E J,RHEE W J,PARK T H.Isolation and characterization of an apoptosis-inhibiting component from the hemolymph of *Bombyx mori*[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2001,285(2):224–228.

[7] PIETRZYK A J,BUJACZ A,ŁOCHYŃSKA M,et al.Isolation,purification,crystallization and preliminary X-ray studies of two 30 kDa proteins from silkworm haemolymph[J].Acta Crystallographica Section F,2011,67(3):372–376.

[8] GOLDSMITH M R,SHIMADA T,ABE H.The genetics and genomics of the silkworm,*Bombyx mori*[J].Annual Review of Entomology,2005,50:71–100.

[9] BRADFORD M M.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J].Analytical Biochemistry,1976,72(1/2):248–254.

[10] ZHOU Z H,YANG H J,CHEN M,et al.Comparative proteomic analysis between the domesticated silkworm (*Bombyx mori*) reared on fresh mulberry leaves and on artificial

diet[J].Journal of Proteome Research,2008,7(12):5103–5111.

[11] GHARAHDAGHI F,WEINBERG C R,MEAGHER D A,et al.Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel:a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity[J].Electrophoresis,1999,20(3):601–605.

[12] LI J S,YE L P,LAN T Y,et al.Comparative proteomic and phosphoproteomic analysis of the silkworm (*Bombyx mori*) posterior silk gland under high temperature treatment[J].Molecular Biology Reports,2012,39(8):8447–8456.

[13] HUANG H D,LEE T Y,TSENG S W,et al.KinasePhos:a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites[J].Nucleic Acids Research,2005,33(S2):W226–W229.

[14] SUN Q,ZHAO P,LIN Y,et al.Analysis of the structure and expression of the 30K protein genes in silkworm,*Bombyx mori*[J].Insect Science,2007,14(1):5–14.

[15] YANG J P,MA X X,HE Y X,et al.Crystal structure of the 30 K protein from the silkworm *Bombyx mori* reveals a new member of the *β*-trefoil superfamily[J].Journal of Structural Biology,2011,175(1):97–103.

[16] 吴能表,朱利泉,王小佳.温度胁迫对甘蓝蛋白质磷酸化的影响[J].西南农业大学学报:自然科学版,2004,26(2):198–200.

[17] WU H Y,TSENG V S M,LIAO P C.Mining phosphopep tide signals in liquid chromatography-mass spectrometry data for protein phosphorylation analysis[J].Journal of Proteome Research,2007,6(5):1812–1821.

Study on 30K Protein Phosphorylation of Silkworm Haemolymph under Heat Shock

LI Na[1] JIA Manli[1] YANG Guiming[1] LI Jisheng[1,2*]

(1. *Sericulture Institute of Chengde Medical University*, *Hebei Universities R&D Centre for Sericulture and Specialty Enabling Technologies*, *Chengde* 067000, *China*; 2. *College of Animal Sciences*, *Zhejiang University*, *Hangzhou* 310029, *China*)

*Corresponding author, associate professor, E-mail: jshlee@163.com (责任编辑 菅景颖)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the expression changes of phosphorylated protein in silkworm haemolymph under heat shock, and provide reference for further study its function. Two groups were designed, and 30 fifth-instar silkworms (half male and half female) were randomly divided in each group, and treated with heat shock under 40 ℃ for 0 (control group) and 10 min (heat shock group), respectively. The differentially expressed phosphorylation proteins were studied utilizing two-dimensional electrophoresis, Pro-Q Diamond dye and mass spectrometry. The results showed as follows: 1) amount of proteins were accumulated in the 30 ku area of silver staining map and revealed as phosphorylated proteins by Pro-Q Diamond dyeing. 2) Three 30K proteins were identified as PBMHPC-6, PBMHPC-19 and PBMHPC-12 by multiple sampling and mass spectrometry identification. 3) Compared with0 min heat shock, the expression levels of three 30K proteins were significantly up-regulated after 10 min heat shock (P<0.05). It is concluded that fifth-instar silkworm haemolymph are rich in 30K proteins. These proteins not only play important roles in lipid transport, but also might involve in heat shock response.

Key words: heat shock; silkworm; haemolymph; 30K proteins; phosphorylation；two-dimensional electrophoresis